

***Phytophthora hydropathica* and *Phytophthora drechsleri* isolated from irrigation canals in the Culiacan Valley**

***Phytophthora hydropathica* y *Phytophthora drechsleri* aisladas de canales de irrigación del Valle de Culiacán**

Brando Álvarez-Rodríguez, Raymundo Saúl García-Estrada, José Benigno Valdez-Torres, Josefina León-Félix, Raúl Allende-Molar*. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. CIAD AC. Área de Horticultura. Km 5.5 Carretera Culiacán-Eldorado, Campo El Diez. Culiacán, Sinaloa, México. CP 80110 Teléfono 6677605536; Sylvia Patricia Fernández Pavía. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Laboratorio de Patología Vegetal, Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales. Km. 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro, Tarímbaro, Michoacán. CP 58880. Teléfono (443) 2958323. (brando.alvarez@estudiantes.ciad.mx, rsgarcia@ciad.mx, jvaldez@ciad.mx, ljosefina@ciad.mx, rallende@ciad.mx, fpavia@umich.mx) *Autor para correspondencia: rallende@ciad.mx

Recibido: 13 de junio 2016.

Aceptado: 27 de septiembre 2016.

Álvarez-Rodríguez B, García-Estrada RS, Valdez-Torres JB, León-Félix J, Allende-Molar R. *Phytophthora hydropathica* and *Phytophthora drechsleri* isolated from irrigation channels in the Culiacan Valley. 35 (1).

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1606-1

RESUMEN

En México, no existen reportes de la presencia de especies de *Phytophthora* en aguas superficiales, de ahí la importancia de determinarlas ya que representan un riesgo para la agricultura del país. En enero de 2015, se muestrearon 25 canales de irrigación en el Valle de Culiacán con el objetivo de identificar las especies de *Phytophthora* presentes. Los aislamientos fueron obtenidos con trampas que consistieron en hojas de azalea y frutos de pera. Se obtuvieron 29 aislamientos de *Phytophthora*, los

ABSTRACT

Up to date, there are no reports of the presence of *Phytophthora* species in surface water bodies in Mexico, which represents a risk for the local agriculture. During January 2015, 25 irrigation channels from Culiacan Valley were sampled for the isolation of *Phytophthora* spp. Isolates were obtained with rhododendron leaves and pear fruits baits. Twenty-nine isolates of *Phytophthora* were obtained and identified, by morphological characteristics together with rDNA sequences of internal transcribed spacers (ITS) and elongation factor 1- α (TEF-1 α). Pathogenicity tests were performed on tomato and pepper leaves, since they are important crops in the region and they are irrigated with water from the sampled channels. Two *Phytophthora* species were identified: *P. hydropathica* and *P. drechsleri*. Isolates of *P. hydropathica* caused necrotic lesions on tomato

cuales fueron identificados con base en características morfológicas y en secuencias de ADNr de los espaciadores internos transcritos (ITS) y del factor de elongación 1- α (TEF-1 α). Se realizaron pruebas de patogenicidad en hojas de tomate y chile, debido a que son cultivos importantes en la región y son irrigados con agua de los canales muestreados. Se identificaron 2 especies: *P. hydropathica* y *P. drechsleri*. Los aislamientos de *P. hydropathica* ocasionaron lesiones necróticas en hojas de tomate y de chile; mientras que los aislamientos de *P. drechsleri* solamente causaron lesiones en hojas de tomate. De acuerdo con nuestro conocimiento, este es el primer reporte de *P. hydropathica* en México.

Palabras clave: agua de riego, oomicetes, cebo, detección, patogenicidad

Las especies de *Phytophthora* tienen el potencial de causar enfermedades devastadoras en ecosistemas forestales y agrícolas (Erwin y Ribeiro, 1996), ya que tienen la capacidad de infectar un amplio rango de hospedantes, tal es el caso de *P. cinnamomi* que es capaz de causar daños en alrededor de 2000 especies de plantas (Hardham, 2005). Otro ejemplo es *Phytophthora sojae*, que afecta un rango de hospedantes muy amplio y causa pérdidas económicas de hasta 2 mil millones de dólares a nivel mundial (Tyler, 2007).

La presencia de oomicetes fitopatógenos en agua de irrigación ha sido ampliamente documentada (Hong y Moorman, 2005); específicamente, existen alrededor de 30 especies del género *Phytophthora* que han sido aisladas de cuerpos de agua superficial como ríos, canales de irrigación, aguas recicladas y reservorios (Hüberli *et al.*, 2013; Zappia *et al.*, 2014).

Las especies de *Phytophthora* requieren de ambientes acuáticos para desarrollar su ciclo de vida

and pepper leaves while isolates of *P. drechsleri* caused necrotic lesions only on tomato leaves. To our knowledge, this is the first report of *P. hydropathica* in Mexico.

Key words: irrigation water, oomycetes, bait, detection, pathogenicity.

Phytophthora species have the potential of causing devastating diseases in forest and agricultural ecosystems (Erwin and Ribeiro, 1996), since they are able to infect a wide range of hosts. Such is the case of *P. cinnamomi*, which can damage approximately 2000 plant species (Hardham, 2005). Another example is *Phytophthora sojae*, which affects a wide range of hosts and causes economic losses of up to 2 billion dollars worldwide (Tyler, 2007).

The presence of plant pathogenic oomycetes in irrigation water has been widely documented (Hong and Moorman, 2005); specifically, there are around 30 species of the genus *Phytophthora*, which have been isolated from surface water bodies such as rivers, irrigation channels, recycled waters, and reservoirs (Hüberli *et al.*, 2013; Zappia *et al.*, 2014).

Phytophthora species require aquatic environments in order to develop their asexual life cycle and therefore spread quickly with the formation of sporangia and zoospores; for this reason, they have been regularly isolated from irrigation water channels, water reservoirs, and rivers (Sutton *et al.*, 2009; Ghimire *et al.*, 2009; Hulvey *et al.*, 2010; Bienapfl and Balci *et al.*, 2014). Examples of species reported with this dispersal mean include *P. cactorum*, *P. parasitica*, *P. citricola*, *P. gonapodyides*, and *P. cambivora*, isolated from irrigation waters in the state of Washington (Yamaket *et al.*, 2002). Recently, one of the species with the greatest incidence in surface

asexual y así dispersarse rápidamente mediante la formación de esporangios y zoosporas; por ello han sido aisladas con regularidad de canales de agua de irrigación, reservorios de agua y ríos (Sutton *et al.*, 2009; Ghimire *et al.*, 2009; Hulvey *et al.*, 2010; Bienapfl y Balci *et al.*, 2014). Algunos ejemplos de especies reportadas con este medio de diseminación son: *P. cactorum*, *P. parasitica*, *P. citricola*, *P. gonapodyides* y *P. cambivora*, aisladas de aguas de irrigación en el estado de Washington (Yamak *et al.*, 2002). Recientemente una de las especies con mayor incidencia en aguas superficiales es la especie *P. hydropathica* (Brazee *et al.*, 2016; Ghimire *et al.*, 2011; Hulvey *et al.*, 2010). En la mayoría de estos casos, la presencia de especies de *Phytophthora* en agua no se ha relacionado con la existencia de síntomas o daños en hospedantes vegetales terrestres (Resser *et al.*, 2011). En México se ha documentado la presencia de 17 especies de *Phytophthora* (Fernandez-Pavía *et al.*, 2015); entre las más estudiadas se encuentran *P. capsici*, *P. cinnamomi* y *P. infestans* (Fernandez-Pavía *et al.*, 2013). La identificación de estas especies se ha efectuado a partir de aislamientos obtenidos de plantas enfermas, principalmente de hortalizas.

Históricamente, las especies de *Phytophthora* han sido identificadas mediante características morfológicas; sin embargo, la identificación es difícil incluso para los expertos, debido a las similitudes de las características entre algunas especies. Actualmente, los análisis moleculares basados en el estudio del ADN, se han utilizado para caracterizar poblaciones de *Phytophthora* en campos agrícolas y en ecosistemas naturales (Blair *et al.*, 2008; Grünwald *et al.*, 2011). Las regiones del genoma más utilizadas para estos estudios son: la región espaciadora interna transcrita (ITS) (Blair *et al.*, 2008) y algunos genes nucleares como el gen que codifica para el factor de elongación 1- α (TEF-1 α) y el gen de la β -tubulina (Kroon *et al.*, 2004).

waters has been *P. hydropathica* (Brazee *et al.*, 2016; Ghimire *et al.*, 2011; Hulvey *et al.*, 2010). In most of these cases, the presence of *Phytophthora* species in water has not been related with the existence of symptoms or damages in terrestrial plant hosts (Resser *et al.*, 2011). In Mexico, the presence of 17 species of *Phytophthora* have been documented (Fernandez-Pavía *et al.*, 2015), the most studied of which include *P. capsici*, *P. cinnamomi*, and *P. infestans* (Fernandez-Pavía *et al.*, 2013). These species have been identified from isolations obtained from diseased plants, mainly vegetables.

Historically, *Phytophthora* species have been identified by their morphological characteristics; however, identification is difficult, even for experts, due to the similarities in characteristics between some species. Currently, molecular analyses based on DNA studies have been used to characterize populations of *Phytophthora* in agricultural fields and in natural ecosystems (Blair *et al.*, 2008; Grünwald *et al.*, 2011). The regions of the genome most used for these studies are the internal transcribed spacer (ITS) (Blair *et al.*, 2008) and some nuclear genes, such as the gene that codifies for the factor of elongation 1- α (TEF-1 α) and the β -tubulin gene (Kroon *et al.*, 2004).

The objectives of this study were to identify *Phytophthora* species from irrigation channels in the Culiacán Valley and to evaluate their pathogenicity in agriculturally important plant in the region.

MATERIALS AND METHODS

Isolate collection

The *Phytophthora* spp. isolates were collected from 25 irrigation channels in District 010 of the

Los objetivos de este estudio fueron identificar especies de *Phytophthora* en canales de irrigación del Valle de Culiacán, así como evaluar su patogenicidad en plantas de importancia hortícola en la región.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de aislados

Los aislamientos de *Phytophthora* spp. se obtuvieron de 25 canales de irrigación del distrito 010 en el Valle de Culiacán durante el mes de enero del 2015 (Cuadro 1). Los sitios de muestreo fueron seleccionados al azar; las trampas utilizadas fueron bolsas de organza cerradas con hilo de nylon en la parte superior, lo que además sirvió para atar las trampas a un punto determinado en la orilla del canal (Figura 1). Las bolsas contenían 1 fruto de pera y 3 hojas de azalea, ambos sin ninguna muestra de daño o enfermedad, y se colocaron 2 bolsas en cada sitio de muestreo. El material vegetal fue lavado con agua corriente y desinfectado con etanol al 70 % durante 30 s antes de ser colocado en las trampas. Las trampas permanecieron en la superficie de los canales de riego durante 48 h (Bush *et al.*, 2003). Posteriormente, las trampas se colectaron y se trasladaron al laboratorio. El aislamiento se realizó colocando pequeñas secciones de tejido vegetal infectado (Figura 2), en medio selectivo que contenía jugo V8 (200 mL/L), pimáricina 10 µg/L, ampicilina 200 µg/L, rifampicina 10 µg/L, pentacloronitrobenzenceno 25 µg/L e hymexazol 50 µg/L (V8-PARPH) (Jeffers, 1986). Las placas Petri se incubaron a temperatura ambiente (25±2 °C) durante 3 a 5 días. De las colonias en formación, se realizó la transferencia de puntas de hifas para la obtención de cultivos puros (Hajebrahimi y Banihashemi, 2011). Finalmente, los aislamientos se

Culiacán Valley in January 2015 (Table 1). The sampling sites were chosen at random; the traps used were organza bags closed with nylon thread in the upper section, which also helped tie the traps to a particular point by the side of the channel (Figure 1). Bags contained 1 pear fruit and 3 azalea leaves, neither one showing any signs of diseases or damages, and 2 bags were placed in each sampling site. Plant material was washed using tap water and disinfected with ethanol at 70 % for 30 s before being placed in the traps. The traps remained in the surface of the irrigation channels for 48 h (Bush *et al.*, 2003). Afterwards, the traps were gathered and taken to the laboratory. The isolation was carried out by placing several sections of infected plant tissue (Figure 2) in a selective medium containing V8 juice (200 mL/L), natamycin 10 µg/L, ampicillin 200 µg/L, rifampicin 10 µg/L, pentachloronitrobenzene 25 µg/L, and hymexazol 50 µg/L (V8-PARPH) (Jeffers, 1986). The Petri dishes were incubated at room temperature (25 ± 2 °C) for 3 to 5 days. The Hyphal tips from developing colonies were transferred to obtain pure cultures (Hajebrahimi and Banihashemi, 2011). Finally, the isolations were preserved placing 5-7 mycelium discs in active growth (5 mm diameter) in corn meal agar (CMA) in microtubes with sterile distilled water, which were then stored at 15 °C (Martin *et al.*, 2012).

Morphological characterization

Sporangia were produced by taking sections of approximately 10 mm² of cultures with 3 to 5-day growth in V8 medium; they were then placed in 90 mm Petri dishes and flooded with sterilized rainwater. The dishes were kept at room temperature (25±2 °C) for 24-48 h (Gallegly and Hong, 2008; Bienapfl and Balci, 2014). The sporangia were observed under a Carl Zeiss Axiostar Imager A2

Cuadro 1. Sitios de muestreo en canales de irrigación en el valle de Culiacán, especies identificadas y accesiones de las secuencias depositadas en NCBI .**Table 1. Sampling sites in irrigation channels in the Culiacán Valley, species identified and accessions of the sequences deposited in NCBI.**

Sitio de muestreo	Coordenadas	Localidad	Aislados	Especie	No. Acceso en Genbank*
1	24° 44' 53" N 107° 26' 43" O	Culiacán	1-1H2 1-2H2	<i>P. drechsleri</i> <i>P. drechsleri</i>	KX298878 KX298879
2	24° 55' 29" N 107° 32' 00" O	Limón de los Ramos	-	-	-
3	24° 55' 15" N 107° 32' 46" O	Limón de los Ramos	3-1F3 3-2F1	<i>P. hydropathica</i> <i>P. hydropathica</i>	KX298862 KX298863
4	24° 53' 45" N 107° 38' 34" O	Villa Ángel Flores	-	-	-
5	24° 53' 45" N 107° 34' 07" O	Villa Ángel Flores	-	-	-
6	24° 53' 04" N 107° 38' 34" O	Villa Ángel Flores	-	-	-
7	24° 51' 39" N 107° 37' 23" O	Villa Ángel Flores	-	-	-
8	24° 51' 03" N 107° 34' 58" O	Culiacancito	-	-	-
9	24° 49' 00" N 107° 32' 11" O	La Palma	-	-	-
10	24° 48' 59" N 107° 32' 10" O	La Higuera	-	-	-
11	24° 50' 20" N 107° 29' 42" O	La Higuera	11F2	<i>P. drechsleri</i>	KX298880
12	24° 46' 18" N 107° 30' 21" O	Aguaruto	-	-	-
13	24° 46' 03" N 107° 38' 19" O	Navolato	13F2	<i>P. hydropathica</i>	KX298864
14	24° 46' 54" N 107° 41' 60" O	Navolato	-	-	-
15	24° 45' 18" N 107° 43' 45" O	Navolato	15-1F1 15-2F3 15-1F3 15-1F2	<i>P. hydropathica</i> <i>P. hydropathica</i> <i>P. hydropathica</i> <i>P. drechsleri</i>	KX298865 KX298866 KX298867 KX298881
16	24° 42' 00" N 107° 40' 22" O	La Pipima	16-1F2 16-1H2 16-2F1 16-1F3	<i>P. hydropathica</i> <i>P. hydropathica</i> <i>P. hydropathica</i> <i>P. drechsleri</i>	KX298868 KX298869 KX298870 KX298882
17	24° 39' 27" N 107° 39' 50" O	Sataya	17-2F2 17-1F1	<i>P. hydropathica</i> <i>P. drechsleri</i>	KX298871 KX298883
18	24° 40' 12" N 107° 35' 44" O	La Michoacana	18-1F1 18-2F1 18-2F2	<i>P. hydropathica</i> <i>P. hydropathica</i> <i>P. hydropathica</i>	KX298872 KX298873 ND
19	24° 37' 03" N 107° 33' 27" O	Las Puentes	-	-	-
20	24° 34' 19" N 107° 33' 08" O	Las Puentes	20-1F1 20-2F1 20-2F2 20-2F3 20-2H1	<i>P. hydropathica</i> <i>P. hydropathica</i> <i>P. hydropathica</i> <i>P. hydropathica</i> <i>P. hydropathica</i>	KX298874 KX298875 ND KX298876 KX298877
21	24° 38' 57" N 107° 30' 28" O	Las Puentes	-	-	-

Continúa Cuadro 1.

Sitio de muestreo	Coordenadas	Localidad	Aislados	Especie	No. Acceso en Genbank*
22	24° 40' 01" N 107° 26' 33" O	Campo Estrella	-	-	-
23	24° 40' 00" N 107° 26' 33" O	El Quemadito	23-1F1	<i>P. drechsleri</i>	KX298884
			23-1F2	<i>P. drechsleri</i>	KX298885
			23-2F1	<i>P. drechsleri</i>	KX298886
			23-2F2	<i>P. drechsleri</i>	KX298887
			23-2F4	<i>P. drechsleri</i>	ND
24	24° 43' 50" N 107° 27' 11" O	El Diez	-	-	-
25	24° 43' 16" N 107° 27' 40" O	El Diez	-	-	-

ND= No determinado / ND= Not determined

*El número de acceso corresponde a las secuencias obtenidas con los iniciadores ELONGF1/ELONGR1 / The accession number corresponds to the sequences obtained with the primers ELONGF1/ELONGR1.

preservaron colocando 5-7 discos de micelio en crecimiento activo (5 mm de diámetro) en medio agar harina de maíz (CMA) en microviales con agua destilada estéril, éstos se almacenaron a 15 °C (Martin *et al.*, 2012).

Caracterización morfológica

Se indujo la producción de esporangios tomando secciones de aproximadamente 10 mm² de co-

light microscope with an integrated camera and measured using the software ZEN 2012 Blue edition (Carl Zeiss).

Structures such as hyphal swellings, antheridia, oogonia and oospores were observed in clarified V8 agar medium (V8 juice under 4000 rpm for 20 min) in cultures of approximately one month of age, incubated in the dark at 20 °C (Mitchell *et al.*, 1992; Bienapfl and Balci, 2014). To determine the maximum growth temperature, discs of 5 mm



Figura 1. Trampa con fruto de pera colocada en un canal de irrigación.
Figure 1. Trap with pear fruit placed in an irrigation channel.



Figura 2. Frutos de pera y hojas de azalea con lesiones de las cuales se realizó el aislamiento.
Figure 2. Pear fruits and azalea leaves with lesions from which the isolation was performed.

lonias con crecimiento de 3 a 5 días en medio V8; posteriormente, se colocaron en placas Petri de 90 mm y se inundaron con agua de lluvia esterilizada. Las placas se mantuvieron a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) durante 24-48 h (Gallegly y Hong, 2008; Bienapfl y Balci, 2014). Los esporangios se observaron en un microscopio óptico marca Carl Zeiss Axiostar Imager A2 con cámara integrada y se midieron con el software ZEN 2012 Blue edition (Carl Zeiss).

Estructuras, tales como clamidosporas, hinchamientos hifales, anteridios, oogonios y oosporas se observaron en medio agar V8 clarificado (jugo V8 sometido a 4000 rpm durante 20 min) en cultivos de 1 mes de edad aproximadamente, incubados en oscuridad a 20 °C (Mitchell *et al.*, 1992; Bienapfl y Balci, 2014). Para determinar la temperatura máxima de crecimiento se colocaron discos de 5 mm de diámetro con crecimiento activo en medio V8 y se incubaron a 30, 35 y 40 °C ± 1 °C.

Tipo de apareamiento. Los aislamientos se confrontaron con cepas de referencia de *P. nicotianae* de tipo de compatibilidad A1 y A2. Una sección de

in diameter with active growth were placed in V8 medium and incubated at 30, 35, and 40 °C ± 1 °C. Mating type. The isolates were confronted with *P. nicotianae* reference strains with compatibility types A1 and A2. A section of 5 mm of isolates A1 and A2 of *P. nicotianae* were transferred to a Petri dish with clarified V8 agar and a disc, 5 mm in diameter, of each of the isolates was placed on the opposite side of the dish. The cultures were incubated at 22 °C for approximately 3 weeks (Bienapfl and Balci, 2014). The morphological characteristics and the dimensions of the antheridia, oogonia, and oospores were recorded for the description of the species. The asexual and sexual structures were compared with a tabular key of *Phytophthora* species (Martin *et al.*, 2012).

Molecular characterization

Approximately 3 mg of mycelia were used, which grew when placing V8 agar discs with active growth, 10 mm in diameter, of each of the isolates in a potato broth medium, and later left for shaking

5 mm de los aislados A1 y A2 de *P. nicotianae* se transfirieron a una placa Petri con agar V8 clarificado y un disco de 5 mm de diámetro de cada uno de los aislados se colocó en el lado opuesto de la placa. Los cultivos se incubaron a 22 °C durante 3 semanas aproximadamente (Bienapfl y Balci, 2014). Las características morfológicas y las dimensiones de los anteridios, los oogonios y las oosporas fueron registradas para la descripción de las especies. Las estructuras asexuales y sexuales fueron comparadas con una clave tabular de especies de *Phytophthora* (Martin *et al.*, 2012).

Caracterización molecular

Se utilizaron aproximadamente 3 mg de micelio, el cual se desarrolló al colocar discos de agar V8 con crecimiento activo de 10 mm de diámetro de cada uno de los aislamientos en medio caldo de papa, y posteriormente colocado en agitación a 150 rpm. A partir del micelio producido, se realizó la extracción de ADN; para esto, se utilizó un amortiguador de digestión (Tris/HCl, 10 mM, pH 8.0; EDTA, 50 mM; SDS, 0.5 %; Triton X-100, 0.5 %; Tween 20, 0.5 %) y 2 µL de proteinasa K (20 mg/mL), seguido de una serie de lavados con cloroformo-alcohol isoamílico (Zelaya-Molina *et al.*, 2011). Para la caracterización de los aislamientos, se utilizaron los iniciadores DC6 (5'-GAGGGACTTTTGGGTAATCA-3') (Bonants *et al.*, 1997) e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990) para amplificar la región que flanquea el ITS de un tamaño aproximado de 1300 pb y los iniciadores ELONGF1 (5'-TCACGATCGACATTGCCCTG-3') y ELONGR1 (5'-ACGGCTCGAGATGACCATG-3') que amplifican un fragmento aproximado de 970 pb de la región central del gen que codifica para el factor de elongación 1- α en la cual no se incluyen intrones (Kroon *et al.*, 2004). La concentración final de la mezcla para la PCR,

at 150 rpm. From the mycelium produced, the DNA extraction was carried out. For this, we used a digestion buffer (Tris/HCl, 10 mM, pH 8.0; EDTA, 50 mM; SDS, 0.5 %; Triton X-100, 0.5 %; Tween 20, 0.5 %) and 2 µL of K proteinase (20 mg/mL), followed by a series of washings with chloroform-isoamylalcohol (Zelaya-Molina *et al.*, 2011). For the characterization of the isolates, the primers DC6 (5'-GAGGGACTTTTGGGTAATCA-3') (Bonants *et al.*, 1997), and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990) were used to amplify the region beside the ITS of an approximate size of 1300 pb and primers ELONGF1 (5'-TCACGATCGACATTGCCCTG-3') and ELONGR1 (5'-ACGGCTCGAGATGACCATG-3') were used to amplify a fragment of approximately 970 pb of the central region of the gene that codifies for elongation factor 1- α in which introns are not included (Kroon *et al.*, 2004). The final concentration of the mixture for PCR consisted of 1X buffer, dNTPs 0.2 mM, each primer at 0.2 mM, 1 unit of polymerase DNA, for a final volume of 25 µL. Amplification conditions for primers DC6/ITS4 consisted of 94 °C for 3 min, followed by 30 cycles of 94 °C for 1 min, 55 °C for 1 min and 72 °C for 1 min, and a final extension of 72 °C for 10 min, and for primers ELONF/ELONR, they consisted of 95 °C for 2 min followed by 35 cycles of 95 °C for 1 min, 60 °C for 1 min and 72 °C for 1 min, and a final extension of 72 °C for 10 min. The PCR products were observed in a 1 % agarose gel dyed with red gel (Biotium, USA) under 70 V for 90 min. Later, the PCR products were purified using the kit wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA). Both chains of the amplicon were sequenced in LANGE BIO, CINVESTAV, Irapuato. The sequences obtained were edited to obtain consensus sequences in the program Bioedit (version 7.2). The sequences of the

consistió de: amortiguador 1X, dNTPs 0.2 mM, cada iniciador a 0.2 mM, 1 unidad de ADN polimerasa, para un volumen final de 25 µL. Las condiciones de amplificación para los iniciadores DC6/ITS4 consistieron en: 94 °C durante 3 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min y 72 °C durante 1 min y una extensión final de 72 °C por 10 min y para los iniciadores ELONF/ELONR consistieron en 95 °C durante 2 min seguidos de 35 ciclos de 95 °C por 1 min, 60 °C por 1 min y 72 °C por 1 min y una extensión final de 72 °C durante 10 min. Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1%, teñido con gel red (Biotium, USA) sometidos a 70 V durante 90 min. Posteriormente, los productos de PCR se purificaron mediante el kit wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA). Ambas cadenas del amplicón fueron secuenciadas en LANGEBIO, CINVESTAV, Irapuato. Las secuencias obtenidas se editaron para obtener secuencias consenso en el programa Bioedit (versión 7.2). Se compararon las secuencias de los aislamientos con secuencias de aislados tipo depositadas en la base de datos especializada de *Phytophthora* (www.phytophthoradb.org) o en NCBI para determinar el porcentaje de similitud.

Evaluación de patogenicidad

Las pruebas de patogenicidad se realizaron en hojas de chile *Capsicum annum* (híbrido 5810 Syngenta) y tomate *Solanum lycopersicum* (variedad Horus). Las hojas de chile y folíolos de tomate completamente desarrollados se lavaron con agua corriente, se secaron y se desinfectaron con etanol al 70 % durante 30 s. Posteriormente, cuatro hojas de cada material, en las que previamente se realizaron heridas con una aguja de disección estéril, se inocularon artificialmente en la parte abaxial colocando un disco con crecimiento activo de las

isolations were compared with sequences of type isolates deposited in the *Phytophthora* specialized database (www.phytophthoradb.org) or in the NCBI to determine the percentage of similarity.

Evaluation of pathogenicity

The pathogenicity tests were carried out on *Capsicum annum* chili pepper leaves (hybrid 5810 Syngenta) and *Solanum lycopersicum* tomato (var. Horus). The completely developed chili leaves and tomato leaflets were washed with tap water, dried, and disinfected with ethanol at 70 % for 30 s. Afterwards, four leaves of each material, in which incisions were previously made with a sterile dissection needle, were inoculated artificially in the abaxial section, placing a disc (5 mm diameter) with active growth from both species of *Phytophthora*, seven days old in PDA medium. One leaf from each plant evaluated was used as a control, in which incisions were also made, and placed in a PDA culture medium disc. All leaves were placed in a wet chamber at room temperature (25 ± 2 °C) for five days, during which the length of the necrotized area of the leaves was recorded on a daily basis (Orlikowskiet *al.*, 2012).

RESULTS AND DISCUSSION

A total of 29 isolates belonging to the genus *Phytophthora* were obtained from infection sites in pear fruits and azalea leaves. Out of the 25 sampling points, *Phytophthora* isolations were obtained from only 10 (Table 1). According to their morphological characteristics, isolates were classified into 2 groups: the first group of 18 isolates that produced sporangia with out papilla, of varying shapes, from oval to globular to obpyriform with a size of 45.8-57.4 x 32.9-36.9 µm (Figure 3A), persistent, with

dos especies de *Phytophthora* (5 mm de diámetro) de siete días de edad en medio PDA. Una hoja de cada planta evaluada se utilizó como testigo, en la cual se realizaron heridas y sólo se colocó un disco de medio de cultivo PDA. Todas las hojas fueron colocadas en una cámara húmeda a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) durante cinco días, tiempo durante el cual se registró diariamente la longitud del área necrosada en la hoja (Orlikowski *et al.*, 2012).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un total de 29 aislados pertenecientes al género *Phytophthora* se obtuvieron a partir de infecciones en pera y hojas de azalea. De los 25 puntos de muestreo se obtuvieron aislados de *Phytophthora* en sólo 10 sitios de muestreo (Cuadro 1). De acuerdo a sus características morfológicas, los aislamientos se clasificaron en 2 grupos: un primer grupo de 18 aislamientos que produjeron esporangios sin papila, de formas variadas desde ovoides, globosas hasta obpiriformes con tamaño de $45.8\text{--}57.4 \times 32.9\text{--}36.9$ µm (Figura 3A), persistentes, con proliferación tanto interna como externa y con esporangióforos largos y simples; los aislamientos produjeron clamidosporas terminales (Figura 3D) e hinchamientos hifales de formas irregulares en cadena y/o en grupos (Figura 3C).

Estos 18 aislamientos fueron heterotáticos y formaron oosporas pleróticas de 24.9 µm de diámetro en promedio y oogonios de 27.6 µm, con anteridios anfiginos (Figura 3B). La reproducción sexual de los aislamientos ocurrió únicamente con el aislado de referencia *P. nicotianae* A2, lo cual indica que los aislamientos son de tipo de compatibilidad A1. La temperatura máxima de crecimiento de los aislamientos fue de 40 °C.

Estas características morfológicas concuerdan con las características de la especie *Phytophthora*

both internal and external proliferations and long and simple sporangiophores; the isolates produced terminal chlamydospores (Figure 3D) and hyphal swellings of irregular shapes in chains and/or in groups (Figure 3C).

These 18 isolates were heterotallic and formed plerotic oospores with an average diameter of 24.9 µm, and oogonios of 27.6 µm, with amphigynous anteridia (Figure 3B). The sexual reproduction of the isolates took place only in reference isolation *P. nicotianae* A2, indicating that the isolates belong to the compatibility type A1. The maximum growth temperature of the isolates was 40 °C.

These morphological characteristics coincide with those for the species *Phytophthora hydropathica* described in the key proposed by Martin *et al.* (2012), as well as the description by Hong *et al.* (2010). It is worth mentioning that these two descriptions of *P. hydropathica* mention that the species *Phytophthora parsiana* presents very similar morphological characteristics. Both researchers set them apart based on the maximum temperature growth, since *P. hydropathica* can grow in temperatures of up to 40 °C, whereas *P. parsiana* does not grow in temperatures above 37 °C. Also, Martin *et al.* (2012) mention that *P. parsiana* does not present chlamydospores, and *P. hydropathica* does.

The 18 isolates with chlamydospores had a compatibility type A1 when confronted with A1 and A2 strains of *P. nicotianae*. This coincides with reports by Hong *et al.* (2010), who report the compatibility type A1 in *P. hydropathica*, therefore this species may not be reproducing sexually, and may survive by means of chlamydospores. According to the morphological characteristics observed, the 18 isolates belong to the species *Phytophthora hydropathica*.

hydropathica descrita en la clave propuesta por Martin *et al.* (2012); así como con la descripción realizada por Hong *et al.* (2010). Cabe mencionar que en esas dos descripciones de *P. hydropathica* se menciona que la especie *Phytophthora parsiana* presenta características morfológicas muy similares. Ambos investigadores las diferencian en base a la temperatura máxima de crecimiento, ya que *P. hydropathica* es capaz de crecer hasta 40 °C, mientras que *P. parsiana* no crece en temperaturas superiores a 37 °C; además, Martin *et al.* (2012) mencionan que *P. parsiana* no presenta clamidosporas, mientras que *P. hydropathica* si las produce.

Los 18 aislamientos con clamidosporas fueron de tipo de compatibilidad A1 cuando se confrontaron con cepas A1 y A2 de *P. nicotianae*; esto coincide con lo reportado por Hong *et al.* (2010), quienes reportan el tipo de compatibilidad A1 en *P. hydropathica*, por lo que posiblemente esta especie no se está reproduciendo de manera sexual y sobreviva por medio de clamidosporas. De acuerdo con la morfología observada, los 18 aislamientos con esporangios sin papila pertenecen a la especie *Phytophthora hydropathica*.

El segundo grupo compuesto por 11 aislamientos comparten características morfológicas que consisten en un patrón petaloide regular de crecimiento en medio de cultivo PDA, esporangios no papilados con forma globosa y ovoide principalmente de base cónica con tamaños de 25.3-42.7 x 18.702-31.5 µm (Figura 4A), persistentes, con proliferación (Figura 4B) tanto interna como externa y con esporangióforos simples; este grupo de aislamientos produjeron hinchamientos hifales (Figura 4C) y no produjeron clamidosporas. Los aislamientos en este grupo fueron heterotáticos, de tipo de compatibilidad A1 formando oosporas pleróticas con un diámetro de 25.2 µm en promedio y anteridios de tamaño de 12.25 µm (Figura 4D). En Michoacán, México se han detectado los dos tipos

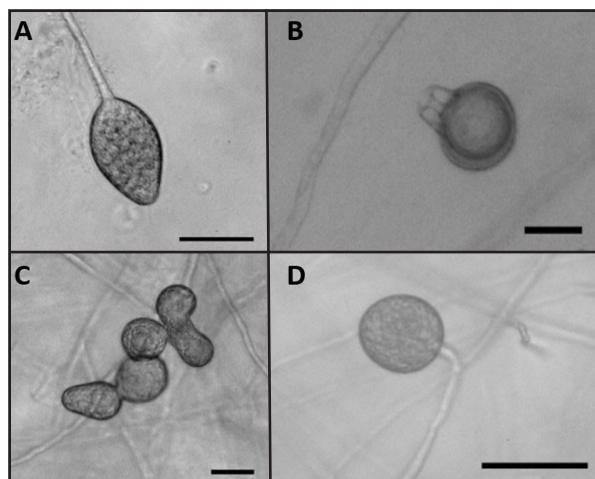


Figura 3. Estructuras morfológicas del aislado 3-1F3 de la especie *P. hydropathica*. (A) Esporangio no papilado, ovoide (B) Oospora plerótica con anteridio anfigino. (C) Hinchamientos hifales irregulares en grupo. (D) Clamidospora esférica y terminal. Barra=20 µm.

Figure 3. Morphological structure of isolate 3-1F3 of the species *hydropathica*. (A) Non-papillated sporangia, oval-shaped (B) Pleroticoospore with amphigynous antheridium. (C) Irregular hyphal swellings in groups. (D) Spherical and terminal chlamydospore. Bar = 20 µm.

The second group, composed of 11 isolates, share morphological characteristics that consist of a regular petaloid growth pattern in PDA culture medium, non-papillated sporangia with globular and oval shapes, mainly with conical bases and sizes of 25.3-42.7 x 18.702-31.5 µm (Figure 4A), persistent, with internal and external proliferations (Figure 4B) and with simple sporangiophores; this group of isolates produced hyphal swellings (Figure 4C) and no chlamydospores. The isolates in this group were heterothallic, and their compatibility type was A1, forming pleroticoosporas with an average diameter of 25.2 µm and 12.25 µm antheridia (Figure 4D). In Michoacán, Mexico the two mating types of mating were found in this species (Mora, 2013), therefore it is likely that if a broader sampling were to be carried out, the type of compatibility A2 could

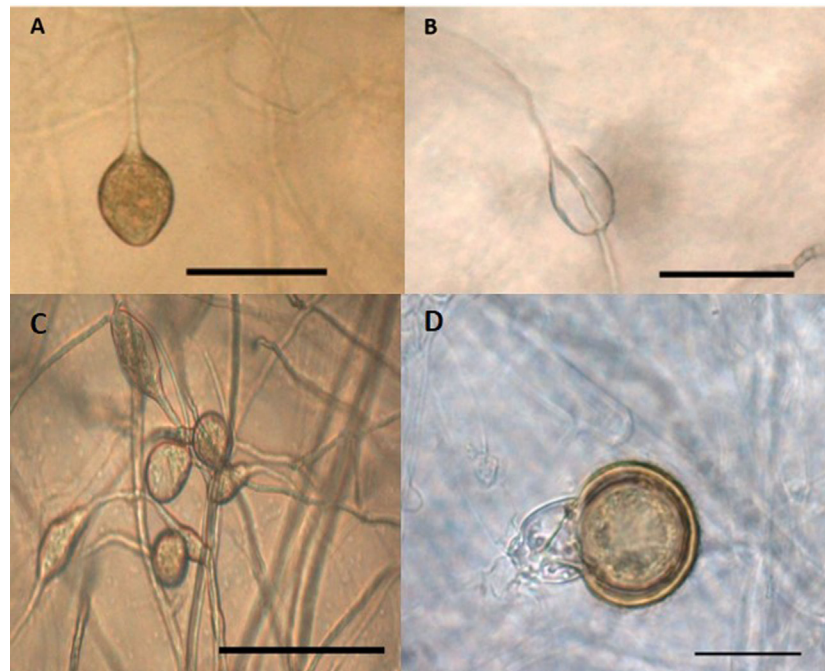


Figura 4. Estructuras morfológicas del aislado 17-1F1 de la especie *P. drechsleri*. (A) Esporangio no papilado, ovoide y de base cónica. Barra = 50 µm. (B) proliferación extendida del esporangio. Barra = 50 µm. (C) hinchamientos hifales. Barra = 50 µm. (D) oospora plerótica con anteridio anfígeno. Barra = 20 µm.

Figure 4. Morphological structures of isolate 17-1F1 of the species *P. drechsleri*. (A) Non-papillated sporangia, oval-shaped and with a conical base. Bar = 50 µm. (B) extended proliferation of the sporangium. Bar = 50 µm. (C) hyphal swellings. Bar = 50 µm. (D) plerotic oospore with amphigynous antheridium. Bar = 20 µm.

de apareamiento en esta especie (Mora, 2013), por lo que es probable que si se realiza un muestreo más extenso se encuentre el tipo de compatibilidad A2. Otra característica de este grupo de aislados es la temperatura máxima de crecimiento que fluctúa entre 35 a 37 °C.

Al comparar estas características con las claves taxonómicas de Erwin y Ribeiro (1996) y de Martin *et al.* (2012) éstas corresponden a la especie *Phytophthora drechsleri*. Es importante señalar que en ambas claves se menciona una estrecha relación de esta especie con *P. cryptogea*, aunque cabe destacar que también se mencionan algunas diferencias entre ambas especies, una de las principales es la temperatura máxima de crecimiento, para *P. cryptogea* existen reportes que indican que no puede crecer a temperaturas de 35 °C o mayores (Perlerou *et al.*,

be found. Another characteristic of this group of isolates is the maximum growth temperature, which fluctuates between 35 and 37 °C.

When comparing these characteristics with the taxonomical keys by Erwin and Ribeiro (1996), and Martin *et al.* (2012), they correspond to the species *Phytophthora drechsleri*. It is important to point out that both keys mention a relationship between this species and *P. cryptogea*, although there are also differences between species. One of the most important is the maximum growth temperature, since there are reports indicating that *P. cryptogea* can not grow in temperatures of 35 °C or above (Perlerou *et al.*, 2010; Kurtbetli, 2014), whereas reports for *P. drechsleri* indicate it can grow in temperatures of up to 37 °C. There are other differences between both, such as the

2010; Kurtbetli, 2014) mientras que para *P. drechsleri* existen reportes que puede crecer incluso hasta 37 °C. Existen otras diferencias entre ambas, tal es el caso del tamaño de las oosporas y de anteridios, *P. drechsleri* produce oosporas de aproximadamente 25.6 µm, mientras que las oosporas de *P. cryptogea* son más pequeñas con tamaños de alrededor de 22 µm. Caso similar ocurre con el tamaño de los anteridios, en donde *P. cryptogea* presenta anteridios más grandes, pudiendo estos alcanzar hasta 19 µm de longitud, mientras que los anteridios de *P. drechsleri* alcanzan tamaños máximos de 14 µm. De acuerdo a las características morfológicas y a las claves taxonómicas se puede inferir que el grupo de 11 aislamientos pertenecen a la especie *P. drechsleri*.

Las reacciones de PCR con los iniciadores DC6-ITS4 con los aislamientos que pertenecen a la especie *P. hydropathica* amplificaron un producto de aproximadamente 1300 pb (Dato no mostrado) y con los iniciadores ELONF-ELONR un producto de 960 pb aproximadamente (Figura 5). Las secuencias consenso mostraron entre 96-98 % de similitud con la especie *Phytophthora hydropathica* (código PD_00342 ITS) en la base de datos especializados en *Phytophthora* (Phytophthoradb.org) para los iniciadores ITS y 99-100 % de similitud con la especie tipo de *P. hydropathica* reportada en NCBI para los dos tipos de iniciadores (EU583793 y GQ260061). Este análisis confirma que estos aislamientos pertenecen a la especie *Phytophthora hydropathica*.

P. hydropathica ha sido aislada con frecuencia de aguas superficiales (Bienalpf y Balci, 2014; Vitale *et al.*, 2014; Copes *et al.*, 2015), principalmente en los meses más cálidos (Copes *et al.*, 2015) pudiendo soportar temperaturas de hasta 40 °C (Hong *et al.*, 2010). También ha sido aislada de plantas enfermas de andrómeda japonesa (*Pieris japonica*) (Bienalpf y Balci, 2014) en viveros y en agua

size of oospores and antheridia: *P. drechsleri* produces oospores sized approximately 25.6 µm and the oospores from *P. cryptogea* are smaller, with sizes of around 22 µm. The antheridia comprise a similar case, in which *P. cryptogea* presents larger antheridia, reaching up to 19 µm in length, while antheridia in *P. drechsleri* only reach 14 µm. According to the morphological characteristics and the taxonomic keys, we can infer that the group of 11 isolates belongs to the species *P. drechsleri*.

The PCR reactions with primers DC6-ITS4 with isolates belonging to the species *P. hydropathica* amplified a product of approximately 1300 pb (Data not shown) and with the primers ELONGF1-ELONGR1, a product of approximately 960 pb (Figure 5). The consensus sequences showed a similarity of 96-98 % with the species *Phytophthora hydropathica* (code PD 00342 ITS) in the database specialized in *Phytophthora* (Phytophthoradb.org) for primers ITS, and a similarity of 99-100 % with the species of the type *P. hydropathica* reported in NCBI for both types of primers (EU583793 and GQ260061). This analysis confirms that these isolations belong to the species *Phytophthora hydropathica*.

P. hydropathica has been frequently analyzed from superficial waters (Bienalpf and Balci, 2014; Vitale *et al.*, 2014; Copes *et al.*, 2015), mainly in the hottest months (Copes *et al.*, 2015) tolerating temperatures up to 40 °C (Hong *et al.*, 2010). It has also been isolated from diseased Japanese andromeda (*Pieris japonica*) plants (Bienalpf y Balci, 2014) in greenhouses and water used in the irrigation of greenhouses (Hulvey *et al.*, 2010), and from ornamental *Viburnum tinus* plants with symptoms of shoot dieback (Vitale *et al.*, 2014).

In the *P. drechsleri* isolation, the reactions of PCR with primers DC6-ITS4 and ELONGF1-ELONGR1 amplified a product of approximately 1300pb (Data not shown) and 970 pb (Figure 5),

utilizada en la irrigación de viveros (Hulvey *et al.*, 2010), y en plantas ornamentales de *Viburnum tinus* con síntomas de muerte regresiva (Vitale *et al.*, 2014).

En los aislamientos de la especie *P. drechsleri*, las reacciones de PCR con los iniciadores DC6-ITS4 y ELONGF1-ELONGR1 amplificaron un producto de aproximadamente 1300 pb (Dato no mostrado) y 970 pb (Figura 5), respectivamente. Las secuencias consenso mostraron una homología de 97 % con respecto a los aislamientos reportados en el NCBI para la especie *Phytophthora drechsleri* (GU111627 y AY659550) confirmando así la identidad de estos aislamientos. *P. drechsleri* se ha encontrado en agua de irrigación a diferentes profundidades; por ejemplo, Bush *et al.* (2003) encontró a esta especie en la superficie del agua de irrigación y a profundidades de 1 y de 1.5 m.

respectively. The consensus sequences showed a homology of 97 % with isolates reported in the NCBI for the species *Phytophthora drechsleri* (GU111627 and AY659550), thus confirming the identity of these isolates. *P. drechsleri* has been found in irrigation water at different depths. For example, Bush *et al.* (2003) found this species on the surface of irrigation water and at depths of 1 and 1.5 m.

Two species of *Phytophthora* were isolated from the surface of 10 irrigation channels in the Culiacán Valley. In the channels where *Phytophthora* was found, *P. hydropathica* was found in only 40 %, in 30 % only *P. drechsleri*, and in 30 %, both species (Figure 6). *P. hydropathica* is considered a native species to river ecosystems (Hong *et al.*, 2010), therefore it is very common to find, in this type of studies, a high frequency of isolates of this species

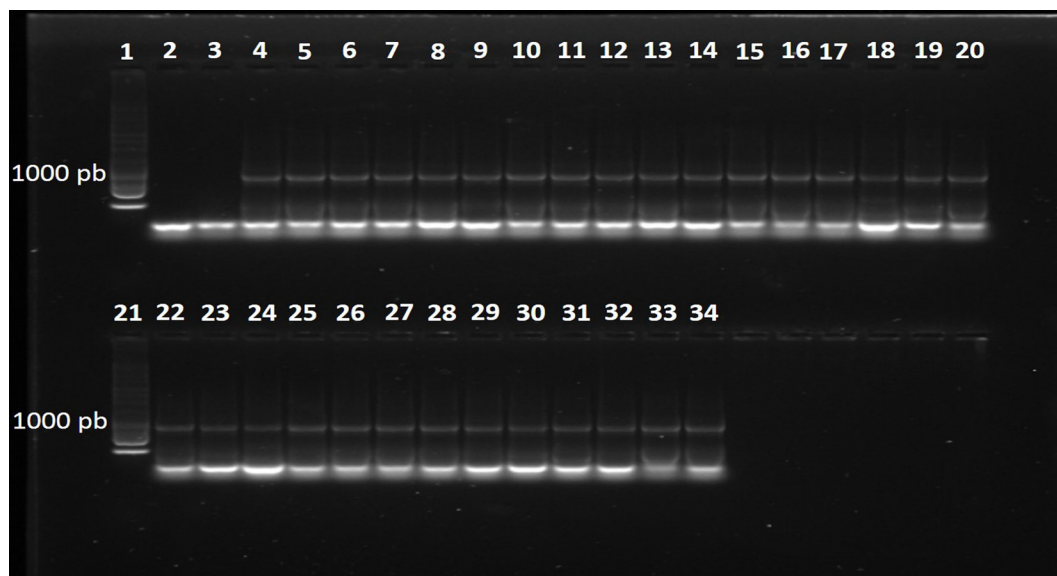


Figura 5. Fragmento de ADN amplificado con los iniciadores ELONGF1/ELONGR1 en aislamientos obtenidos de agua de irrigación. Línea 1, marcador molecular de 1 Kb; Línea 2, agua; Línea 3, control negativo (*C. gloeosporioides*); Línea 4, control positivo (*P. capsici*); Líneas 5-15, aislamientos de la especie *P. drechsleri*; Líneas 16-20, aislamientos de la especie *P. hydropathica*; Línea 21, marcador molecular de 1 Kb; Líneas 22-34, aislamientos de la especie *P. hydropathica*.

Figure 5. Fragment of DNA amplified with primers ELONGF1/ELONGR1 in isolates obtained from irrigation water. Line 1, 1 Kb molecular marker; Line 2, water; Line 3, negative control (*C. gloeosporioides*); Line 4, positive control (*P. capsici*); Lines 5-15, isolates of the species *P. drechsleri*; Lines 16-20, isolates of the species *P. hydropathica*; Line 21, 1 Kb molecular marker; Lines 22-34, isolates of the species *P. hydropathica*.

Dos especies de *Phytophthora* se aislaron de la superficie de 10 canales de irrigación del Valle de Culiacán; en el 40 % de los canales en donde se detectó la presencia de *Phytophthora* se encontró únicamente *P. hydropathica*, en el 30 % solamente *P. drechsleri* y en el 30 % ambas especies (Figura 6). *P. hydropathica* es considerada una especie nativa de ecosistemas fluviales (Hong *et al.*, 2010) por lo que es muy común en este tipo de estudios encontrar una alta frecuencia de aislamientos de esta especie (Bienapfl y Balci, 2014; Brazee *et al.* 2016).

Las secuencias obtenidas con los iniciadores ELONGF1-ELONGR1 que corresponden a las secuencias del gen que codifica para el factor de elongación 1- α de ambas especies se depositaron en la base datos del NCBI (Cuadro 1).

En las pruebas de patogenicidad, los aislamientos representativos 13F2, 15-1F1, 3-2F1, 18-2F1, 16-2F1, 20-2F1, 15-2F3, 3-1F3, 16-1F2 y 16-1H2 de *P. hydropathica* causaron síntomas visibles de necrosis a las 48 h después de la inoculación en folíolos de tomate y en hojas de chile (Cuadro 2; Figura 7) en contraste con las hojas utilizadas como testigo, en donde no se observaron síntomas. Los

(Bienapfl and Balci, 2014; Brazee *et al.* 2016).

The sequences obtained with primers ELONGF1-ELONGR1 that correspond to the sequences of the gene that codifies for elongation factor 1- α in both species were deposited in the NCBI database (Table 1).

In the pathogenicity tests, representative *P. hydropathica* isolates 13F2, 15-1F1, 3-2F1, 18-2F1, 16-2F1, 20-2F1, 15-2F3, 3-1F3, 16-1F2, and 16-1H2 caused visible necrosis symptoms 48 h after inoculation in tomato leaflets and chilli pepper leaves (Table 2; Figure 7), as opposed to the leaves used as a control, where there were no symptoms present. The isolations were more aggressive on chilli leaves, causing necrosis on the entire leaf (45 mm), 120 h after inoculation, while in tomato leaves, the largest lesion measured 26 mm (Table 2). Hong *et al.* (2010) mention chilli pepper, tomato, and cucumber plants as possible hosts, which was confirmed in this study for chilli and tomato. These studies show that *P. hydropathica* is a threat for tomato and chilli crops, which are extremely important in this region. Similar studies (Bienapfl and Balci, 2014; Brazee *et al.*, 2016),

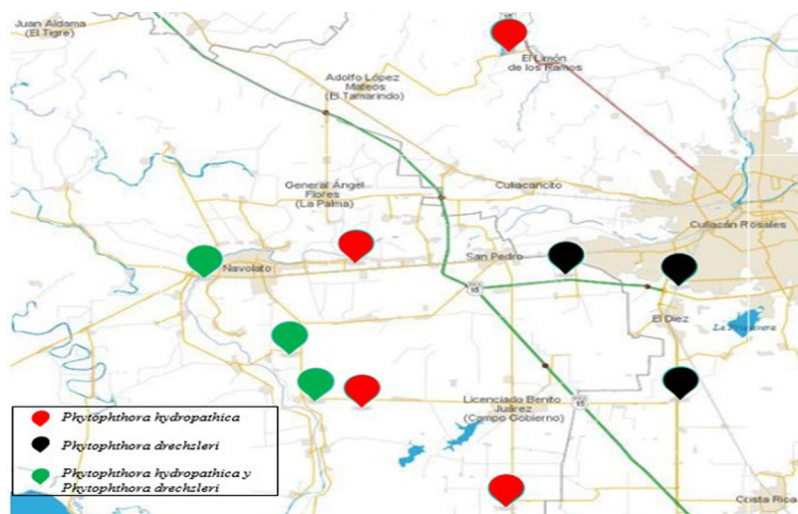


Figura 6. Distribución de *P. hydropathica* y *P. drechsleri* en canales de irrigación del Valle de Culiacán.

Figure 6. Distribution of *P. hydropathica* and *P. drechsleri* in irrigation channels in the Culiacán Valley.

aislados fueron más agresivos en hojas de chile, causando necrosis en toda la hoja (45 mm) 120 h después de la inoculación, mientras que en hojas de tomate la lesión mayor fue de 26 mm (Cuadro 2). Hong *et al.* (2010) mencionan como posibles hospedantes a chile, tomate y pepino; lo cual se confirmó en este estudio para los dos primeros, estos resultados muestran que *P. hydropathica* representa un riesgo para los cultivos de tomate y chile, que son de gran importancia en esta región. En estudios similares (Bienapfl y Balci, 2014; Brazee *et al.*, 2016) se menciona que aunque *P. hydropathica* raramente se ha encontrado asociada a enfermedades en plantas, si posee el potencial para causar enfermedades.

Los aislados 16-1F3, 1-2H2, 17-1F1, 15-1F2, 23-1F1, 1-1H2, 11F2, 23-2F1, 23-1F3, 23-2F4 y 23-2F2 de la especie *P. drechsleri* solo infectaron foliolos de tomate (Cuadro 2; Figura 8), en los cuales se presentaron síntomas de necrosis, aproximadamente 48 h después de la inoculación. Las lesiones en foliolos de tomate fueron de hasta 45 mm después de 120 h, mientras que las hojas de chile no presentaron síntomas aparentes; esto puede deberse a que el híbrido utilizado para el bioensayo posiblemente presente tolerancia a los aislados utilizados. Erwin y Ribeiro (1996) mencionan que *P. drechsleri* se ha reportado como agente causal de pudriciones en frutos de tomate y chile. En México, *P. drechsleri* ha sido reportada infectando cártamo, chile ají, gerbera, lechuga, nochebuena y tomate (Mills *et al.*, 1991; Romero-Cova y Solis-Aragon, 1996; Fernandez-Pavía *et al.*, 2013).

Este primer estudio en México en los canales de riego del valle de Culiacán demuestra la presencia de *P. hydropathica* y *P. drechsleri* y resalta la importancia del agua de riego como medio de diseminación de ambos patógenos. Al mismo tiempo, sienta las bases para la realización de futuros estudios como conocer la dinámica poblacional a lo lar-

Cuadro 2. Longitud de la lesión ocasionada por *P. hydropathica* y *P. drechsleri* en hojas de chile y foliolos de tomate.

Table 2. Length of the lesion caused by *P. hydropathica* and *P. drechsleri* in chili pepper leaves and tomato leaflets.

Aislado	Especie	Longitud de la lesión (mm) 120 hdi	
		Hoja de chile	Foliolo de tomate
13F2	<i>P. hydropathica</i>	45	24
15-1F1	<i>P. hydropathica</i>	35	23
3-2F1	<i>P. hydropathica</i>	33	20
18-2F1	<i>P. hydropathica</i>	35	17
16-2F1	<i>P. hydropathica</i>	45	26
20-2F1	<i>P. hydropathica</i>	45	20
15-2F3	<i>P. hydropathica</i>	45	15
3-1F3	<i>P. hydropathica</i>	45	18
16-1F2	<i>P. hydropathica</i>	45	20
16-1H2	<i>P. hydropathica</i>	45	15
16-1F3	<i>P. drechsleri</i>	-	30
1-2H2	<i>P. drechsleri</i>	-	45
17-1F1	<i>P. drechsleri</i>	-	25
15-1F2	<i>P. drechsleri</i>	-	15
23-1F1	<i>P. drechsleri</i>	-	15
1-1H2	<i>P. drechsleri</i>	-	15
11F2	<i>P. drechsleri</i>	-	25
23-2F1	<i>P. drechsleri</i>	-	15
23-1F3	<i>P. drechsleri</i>	-	35
23-2F4	<i>P. drechsleri</i>	-	30
23-2F2	<i>P. drechsleri</i>	-	15

hdi= horas después de inoculación; 45 mm= hoja completa /
hdi= hours after inoculation; 45 mm= complete leaf..

mention that although *P. hydropathica* rarely has been found to have a relation to plant diseases, it does have the potential to cause diseases.

Isolates 16-1F3, 1-2H2, 17-1F1, 15-1F2, 23-1F1, 1-1H2, 11F2, 23-2F1, 23-1F3, 23-2F4 y 23-2F2 of the species *P. drechsleri* only infected tomato leaflets (Table 2; Figure 8), in which symptoms of necrosis were observed approximately 48 h after inoculation. Lesions in tomato leaflets measured up to 45 mm after 120 h, while chili leaves showed no apparent symptoms, possibly due to the hybrid used for the bioassay may be tolerant to the

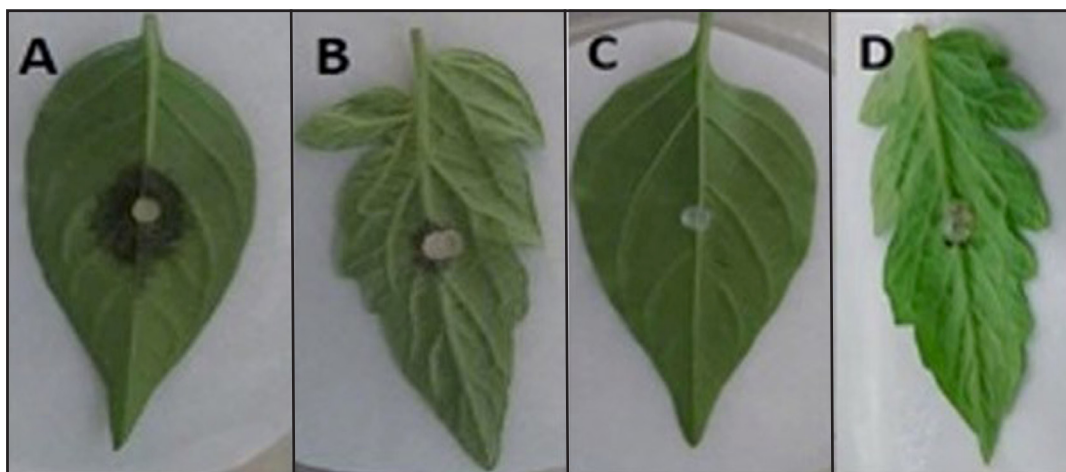


Figura 7. Patogenicidad de *P. hydropathica* 3-1F3 en hojas de chile y folíolos de tomate 48 h después de la inoculación. (A) Hoja de chile inoculada. (B) Foliolo de tomate inoculado. (C) y (D) Hoja de chile y foliolo de tomate testigos.

Figure 7. Pathogenicity of *P. hydropathica* 3-1F3 in chili pepper leaves and tomato leaflets 48 h after inoculation. (A) Inoculated chili leaf. (B) Inoculated tomato leaflet. (C) and (D) Control chili leaf and tomato leaflet.

go del ciclo agrícola; determinar si estas especies solo utilizan los canales de riego como medio de diseminación o completan su ciclo de vida en estos cuerpos de agua; así como determinar la presencia de *P. hydropathica* y *P. drechsleri* en infecciones

isolates used. Erwin and Ribeiro (1996) mention that *P. drechsleri* has been reported as the causal agent of fruit rot in tomato and chili. In Mexico, *P. drechsleri* has been reported to infect safflower, chili pepper, gerbera, lettuce, poinsettia, and tomato

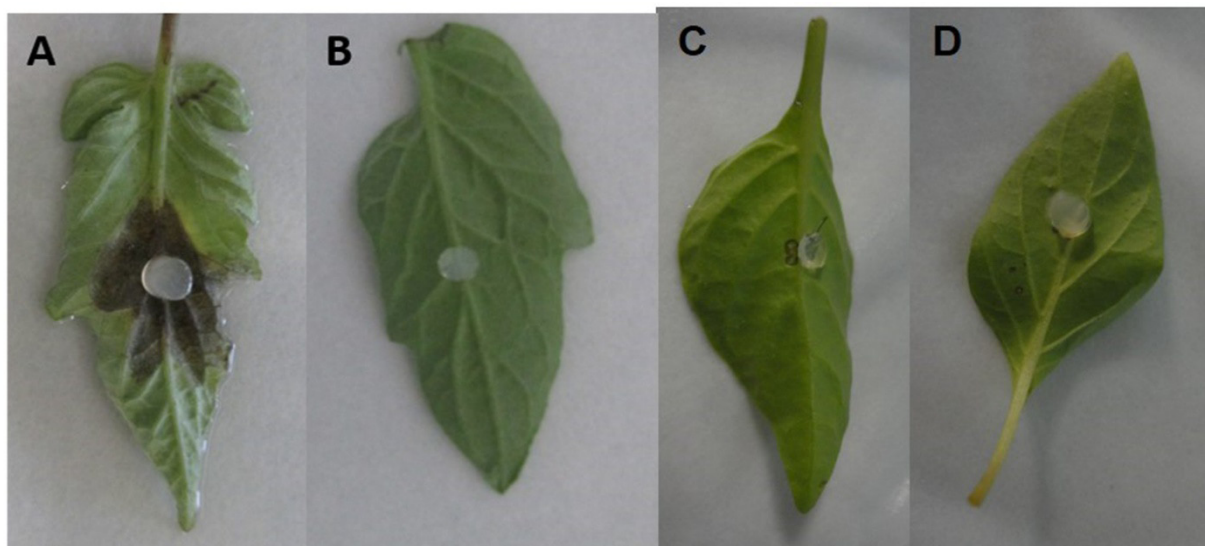


Figura 8. Patogenicidad de *P. drechsleri* 1-2H2 en folíolos de tomate 48 h después de la inoculación. (A) Foliolo de tomate inoculado. (B) Foliolo de tomate testigo. (C) hoja de chile inoculada. (D) hoja de chile testigo.

Figure 8. Pathogenicity of *P. drechsleri* 1-2H2 in tomato leaflets 48 h after inoculation. (A) Inoculated tomato leaflet. (B) Control tomato leaflet. (C) Inoculated chili leaf. (D) Control chili leaf.

naturales en plantas de importancia hortícola en la región. Este es el primer reporte de *Phytophthora hydropathica* en canales de riego en México. Estos resultados indican que es necesario continuar con investigaciones en ambientes naturales, ya sea en aguas superficiales o en suelos para conocer las diversas especies de *Phytophthora* presentes en México y de este modo considerar el riesgo potencial que estos microorganismos representan para la agricultura del país.

CONCLUSIONES

En este estudio se detectó la presencia de *Phytophthora hydropathica* y *Phytophthora drechsleri* en los canales de irrigación del Valle de Culiacán. Estas especies mostraron patogenicidad diferencial en hojas de chile y en folíolos de tomate.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por el financiamiento a los estudios de Brando Álvarez Rodríguez.

LITERATURA CITADA

- Bienapfl JC and Balci Y. 2014. Movement of *Phytophthora* spp. in Maryland's trade. Plant Disease 98:134-144. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-06-13-0662-RE>
- Blair JE, Coffey M, Park S, Geiser DM and Kang S. 2008. A multi-locus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences. Fungal Genetics and Biology 45:266-277. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2007.10.010>
- Bonants P, Hagenaar de Weerd M, van Gent-Pelzer M, Lacourt, Cooke D and Duncan M. 1997. Detection and identification of *Phytophthora fragariae* Hickman by the polymerase chain reaction. European Journal of Plant Pathology 103:345-355. Disponible en línea: <http://link.springer.com/article/10.1023%2FA%3A1008640227432>
- Brazeo NJ, Wick RL and Hulvey JP. 2016. *Phytophthora* species recovered from the Connecticut River Valley in Massachusetts, USA. Mycologia 108:6-19. <http://dx.doi.org/10.3852/15-038>
- Bush EA, Hong CX and Stromberg EL. 2003. Fluctuations of *Phytophthora* and *Pythium* spp. in components of a

(Mills *et al.*, 1991; Romero-Cova and Solis-Aragon, 1996; Fernandez-Pavía *et al.*, 2013).

This first study in Mexico in the irrigation channels in the Culiacán Valley shows the presence of *P. hydropathica* and *P. drechsleri* and highlights the importance of irrigation waters as a way of spreading both pathogens. At the same time, it lays the foundations for future studies, such as knowing the population dynamics through out the agricultural cycle, determining whether these species only use irrigation channels as a way of dissemination or if they complete their life cycle in these bodies of water, as well as to determining the presence of *P. hydropathica* and *P. drechsleri* in natural infections of horticulturally important plants in the region. This is the first report on *Phytophthora hydropathica* in irrigation channels in Mexico. These results indicate that it is necessary to continue research on natural environments, whether in superficial waters or in soils, to know the diverse species of *Phytophthora* present in Mexico, and therefore consider the potential risk these microorganisms represent for Mexican agriculture.

CONCLUSIONS

This study detected the presence of *Phytophthora hydropathica* and *Phytophthora drechsleri* in the irrigation channels of the Culiacán Valley. These species showed differential pathogenicity in chili pepper leaves and tomato leaflets.

ACKNOWLEDGEMENTS

To CONACYT for funding Brando Álvarez Rodríguez's studies.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

- recycling irrigation system. *Plant Disease* 87:1500-1506. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.12.1500>
- Copes WE, Yang X and Hong CX. 2015. *Phytophthora* species recovered from irrigation reservoirs in Mississippi and Alabama nurseries and pathogenicity of three new species. *Plant Disease* 99:1390-1395. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-11-14-1197-RE>
- Erwin DC and Ribeiro OK. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. First edition, APS press, St. Paul, MN. 562 p.
- Fernandez-Pavía SP, Díaz-Celaya M and Rodríguez-Alvarado G. 2013. *Phytophthora* in Mexico. Pp: 215-221. In: Lamour K. (ed.). *Phytophthora: A global perspective*. CAB International. USA. 257 p.
- Fernández-Pavía SP, Gregorio-Cipriano R, Rodríguez-Alvarado G, Fernández-Pavía YL, Mondragón-Flores A, Gómez-Dorantes N, Lozoya-Saldaña H, Rodríguez-Fernández R y Herrera-Camacho J. 2015. Enfermedades de especies vegetales en México. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Primera edición. Morelia, México. 425 p.
- Galleghy ME and Hong CX. 2008. *Phytophthora*: identifying species by morphology and DNA fingerprints. Primera edición. APS Press. St Paul, MN, USA. 168 p.
- Ghimire SR, Richardson PA, Moorman GW, Lea-Cox JD, Ross DS and Hong CX. 2009. An *in-situ* baiting bioassay for detecting *Phytophthora* species in irrigation runoff containment basins. *Plant Pathology* 58:577-583. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.02016.x>
- Ghimire SR, Richardson PA, Kong PHJ, Lea-Cox JD, Ross DS, Moorman GW and Hong CX. 2011. Distribution and diversity of *Phytophthora* species in nursery irrigation reservoir adopting water recycling system during winter months. *Journal of Phytopathology* 159:713-719. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0434.2011.01831.x>
- Grünwald NJ, Martin FN, Larsen MM, Sullivan CM, Press CM, Coffey MD, et al. 2011. *Phytophthora*-ID.org: A sequence-based *Phytophthora* identification tool. *Plant Disease* 95:337-342. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-08-10-0609>
- Hajebrahimi S and Banihashemi Z. 2011. Host range of *Phytophthora parsiana*: a new high temperature pathogen of woody plants. *Phytopathologia Mediterranea* 50:159-165. [http://dx.doi.org/10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-3055](http://dx.doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-3055)
- Hardham AR. 2005. *Phytophthora cinnamomi*. *Molecular Plant Pathology* 6:589-604. <http://dx.doi.org/10.1111/J.1364-3703.2005.00308.X>
- Hong CX, Galleghy ME, Richardson PA, Kong P, Moorman GW, Lea-Cox JD and Ross DS. 2010. *Phytophthora hydrophatica*, a new pathogen identified from irrigation water, *Rhododendron catawbiense* and *Kalmia latifolia*. *Plant Pathology* 59:913-921. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02323.x>
- Hong CX and Moorman GW. 2005. Plant pathogens in irrigation water: Challenges and Opportunities. *Critical Reviews in Plant Science* 24:189-208. Disponible en línea: <http://www.nurserycropscience.info/water/pathogens/technical-pubs/hong-and-moorman-2005.pdf/view>
- Hüberli D, Hardy GE St J, White D, Williams N and Burgess TI. 2013 Fishing for *Phytophthora* from Western Australia's waterways: a distribution and diversity survey. *Australasian Plant Pathology* 42:251-260. <http://dx.doi.org/10.1007/s13313-012-0195-6>
- Hulvey J, Gobena D, Finley L and Lamour K. 2010. Co-occurrence and genotypic distribution of *Phytophthora* species recovered from watersheds and plant nurseries of eastern Tennessee. *Mycologia* 102:1127-1133. <http://dx.doi.org/10.3852/09-221>
- Jeffers SN and Martin SB. 1986. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Disease* 70:1038-1043. Disponible en línea: [https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1986Articles/PlantDisease70n11\\_1038.pdf](https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1986Articles/PlantDisease70n11_1038.pdf)
- Kroon LPNM, Bakker FT, van den Bosh GBM, Bonants PJM and Flier WG. 2004. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Fungal Genetics and Biology* 41:766-782. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2004.03.007>
- Kurtbetli I. 2014. Involvement of *Phytophthora cryptogea* in sweet cherry decline in Turkey. *Phytoparasitica* 42:627-630. <http://dx.doi.org/10.1007/s12600-014-0403-8>
- Martin FN, Abad ZG, Balci Y and Ivors K. 2012. Identification and detection of *Phytophthora*: Reviewing our progress, identifying our needs. *Plant Disease* 96:1080-1103. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-12-11-1036-FE>
- Mills SD, Foerster H and Coffey MD. 1991. Taxonomic structure of *Phytophthora cryptogea* and *P. drechsleri* based on isozyme and mitochondrial DNA analyses. *Mycological Research*. 95:31-48. [http://dx.doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)81359-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0953-7562(09)81359-2)
- Mitchell DJ and Kannwischer-Mitchell ME. 1992. *Phytophthora*. Pp: 31-38. In: Singleton LE, Mihail JD and Riush CM. (eds.). *Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi*. American Phytopathological Society, St, Paul, MN. 266 p.
- Mora DAN. 2013. Variabilidad genética de aislados de *P. capsici* y *Phytophthora drechsleri* de plantas ornamentales. Tesis de Maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán. 112 p.
- Orlikowski LB, Ptasek ATM and Orlikowska T. 2012. Relationship between source of water, occurrence and pathogenicity of *Phytophthora plurivora*. *Acta Mycologica* 47:3-9. Disponible en línea: <https://pbsociety.org.pl/journals/index.php/am/article/viewFile/am.2012.001/2195>
- Perlerou C, Tziros G, Vetraino AM and Diamandis S. 2010. *Phytophthora cryptogea* causing ink disease of *Castanea sativa* newly reported in Greece. *Plant Pathology* 59:799. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02268.x>
- Reeser PW, Sutton W, Hansen EM, Remigi P and Adams GC. 2011. *Phytophthora* species in forest streams in Oregon and Alaska. *Mycologia* 103:22-35. <http://dx.doi.org/10.3852/10-013>
- Romero-Cova S and Solis-Aragon G. 1996. New hosts of some species of the genus *Phytophthora* (Phycomycetes: Pythiaceae) in Mexico. *Agrociencia* 30:241-247.
- Sutton W, Hansen EM, Reeser PW and Kanaskie A. 2009. Stream monitoring for detection of *Phytophthora ramorum* in Oregon tanoak forest. *Plant Disease* 93:1182-1186. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-93-11-1182>
- Tyler BM. 2007. *Phytophthora sojae*: root rot pathogen of soybean and model oomycete. *Molecular Plant Pathology* 8:1-8. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1364-3703.2006.00373.x>

- Vitale S, Luongo L, Galli M and Belisario A. 2014. First report of *Phytophthora hydropathica* causing wilting and shoot dieback on *Viburnum* in Italy. Plant Disease 98:1582. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-03-14-0308-PDN>
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp: 315-322. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. (eds.) PCR protocols: A guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, U.S.A. 461 p.
- Yamak F, Peever TL, Grove GG and Boal RJ. 2002. Occurrence and identification of *Phytophthora* spp. pathogenic to pear fruit in irrigation water in the Wenatchee River valley of Washington State. Phytopathology 92:1210-1217. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.11.1210>.
- Zappia RE, Hüberli D, Hardy GE St. J and Bayliss KL. 2014. Fungi and oomycetes in open irrigation systems: knowledge gaps and biosecurity implications. Plant Pathology 63:961-972. <http://dx.doi.org/10.1111/ppa.12223>
- Zelaya-Molina L, Ortega M and Dorrance A. 2011. Easy and efficient protocol for oomycete DNA extraction suitable for population genetic analysis. Biotechnology Letters 33:715-720. <http://dx.doi.org/10.1007/s10529-010-0478-3>